

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861392

研究課題名(和文)低酸素誘導性因子HIFの活性化による肺胞上皮細胞保護効果の検討

研究課題名(英文)The protective effects of activation of HIF on alveolar epithelial cells

研究代表者

高木 俊介(TAKAKI, Shunsuke)

横浜市立大学・医学部・講師

研究者番号：90644823

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：プロリルヒドロキシラーゼ(PHD)阻害剤であるジメチルオキサリルグリシン(DMOG)によるHIF-1の活性化が肺胞上皮細胞のFasL誘導性アポトーシス与える影響を検討した。DMOGはFasLによるMLE12細胞のアポトーシスを抑制した。HIF-1のDNA結合阻害剤であるエキノマイシン、もしくはsiRNAによるHIF-1経路の阻害はDMOGの抗アポトーシス効果を消失させた。FasLを気管内投与した動物においてもDMOG投与が肺胞上皮細胞のアポトーシスを減少させ、肺胞バリアーの破綻、組織学的変化を抑制した。PHD阻害はFasL誘導性アポトーシスを抑制し、肺傷害を軽減する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effect of stabilization of HIF-1 by treatment with dimethyloxalylglycine (DMOG); a prolyl hydroxylase inhibitor on FasL-induced alveolar epithelial apoptosis in vitro and in vivo. DMOG increased HIF-1 protein levels in MLE12 cells, and attenuated FasL-induced caspase activation and cell death. Inhibition of HIF-1 pathway by echinomycin; an inhibitor of HIF-1 binding to DNA, or by siRNA transfection abolished the anti-apoptotic effect of DMOG. Intraperitoneal administration of DMOG also suppressed apoptosis in lung tissues in the mice intratracheally instilled with FasL. Moreover, DMOG attenuated disruption of alveolar barrier and histological changes in these mice. Prolyl hydroxylase inhibition protects lung epithelial cells from FasL-induced apoptosis and attenuated the lung injury.

研究分野：集中治療医学

キーワード：肺傷害 アポトーシス 低酸素誘導性因子

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) ARDS の病態

急性呼吸窮迫症候群(ARDS)は集中治療領域における主要な死因の一つであるが、有効な治療法は明らかとなっておらず、その開発は急務である。肺胞上皮細胞の傷害による肺胞バリアー機能の破綻が ARDS における病態の大きな特徴である。肺胞上皮細胞傷害に伴うバリアー機能の破綻は、呼吸不全のみならず全身炎症を増悪させることが報告されている。肺胞上皮細胞の傷害機序は様々であるが、近年、Fas/FasL を介したアポトーシスが大きな役割を果たしていることが明らかになってきた(Perl et al. AJRCCM 2007)。

### (2) 低酸素誘導性因子

低酸素誘導性因子 HIF は低酸素によって活性化される転写因子で、生体の低酸素適応における key regulator としての役割を果たす。HIF はサブユニットとサブユニットからなる 2 量体で、酸素の存在下ではサブユニットがプロリルヒドロキシラーゼ(PHD)によって水酸化され、その後ユビキチンプロテアソーム系にて分解される一方、サブユニットは恒常的に充分量が発現している。低酸素環境では PHD による水酸化が起こらなくなり、サブユニットが安定化することで転写活性が増加する。HIF-1 は抗アポトーシス作用をもち、PHD 阻害薬による HIF の活性化が虚血再灌流モデルや腸炎モデルにおいて細胞を保護することが報告されている(Hill et al. J Am Soc Nephrol 2008, Cummins et al. Gastroenterology 2008)。

## 2. 研究の目的

以上の背景を踏まえ、PHD 阻害剤による HIF の活性化が肺胞上皮細胞の FasL 依存性アポトーシスを抑制し、肺傷害を軽減するか検討することとした。肺胞上皮細胞培養系およびマウスの肺において PHD 阻害剤のジメチルオキサリルグリシン(DMOG)が HIF-1 の活性化を介して FasL 誘導性アポトーシスを抑制するか検討した。さらに、FasL 誘導性肺傷害マウスにおける肺胞バリアーの破綻、炎症反応、組織学的な変化に対して DMOG がどのような影響を与えるか検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞培養

マウス肺胞上皮細胞株 MLE12 細胞を DMOG(Cayman Chemical)もしくは vehicle(エタノール)を含む培地で 24 時間培養した後に、ヒトリコンビナント FasL(Adipogen)で 2 時間刺激した。また、エキノマイシンを用いて HIF-1 の転写活性を抑制する、あるいは HIF-1 siRNA (M-040638-00, siGENOME Mouse Hif1a siRNA SMARTpool; Thermo Fisher

Scientific)

をトランスフェクトすることで、DMOG の効果が HIF-1 依存性であるか確かめた。

### (2) 動物実験

オスの C57BL/6J マウスに 10mg の DMOG もしくは vehicle(PBS)を 2 時間毎に計 3 回腹腔内投与した。2 回目の DMOG もしくは PBS の腹腔内投与時に 500ng の FasL もしくは PBS を気管内投与した。16 時間後に、肺組織、気管支肺胞洗浄液(BALF)を採取した。

### (3) Caspase-3/7 活性の測定

細胞ライセート及び肺組織ホモジネート中の Caspase-3/7 の活性を蛍光もしくは発光で検出するキット(Cell Technology, Promega)を用いて測定した。測定値は総タンパク量で標準化した。

### (4) 細胞生存率の計測

FasL 投与 4 時間後の MLE12 細胞の生存率を WST-8(Nacalai Tesque)を用いた測定キットを用いて測定した。FasL を投与していない MLE12 細胞の生存率を 100%として、生存率の計算を行った。

### (5) ELISA

細胞ライセート及び肺組織ホモジネート中の HIF-1、Fas、BALF 中の IgM 濃度を ELISA キットを用いて測定した。細胞ライセート、肺組織ホモジネートにおける測定値は総タンパク量で標準化した。

### (6) Reverse transcription-qPCR

MLE12 細胞より RNA 抽出カラム(Nucleospin, Takara)を用いて抽出、逆転写し cDNA を得た。ターゲット遺伝子の特異的プライマー、SyberGreen(Takara)を用いて定量的 PCR を行った。

### (7) TUNEL 染色

パラフィン包埋した肺組織における DNA 断片化を、TUNEL 染色キット(Promega)を用いて検出した。陽性細胞を DAPI にて染色された総細胞数で除して標準化した。

### (8) 組織学的評価

ヘマトキシリン-エオジン染色を行った肺組織を用いて、肺傷害動物モデルに関する ATS workshop report(Matute-Bello G. et al AJRCMB 2011)に従って、組織学的評価を行った。

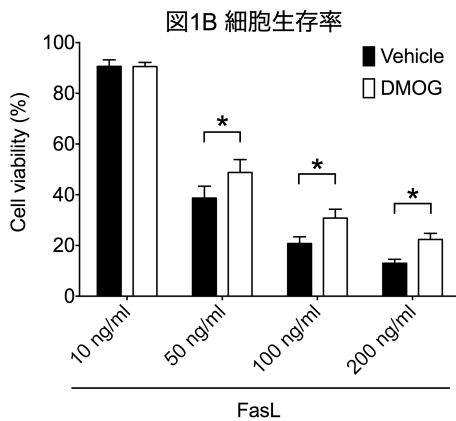
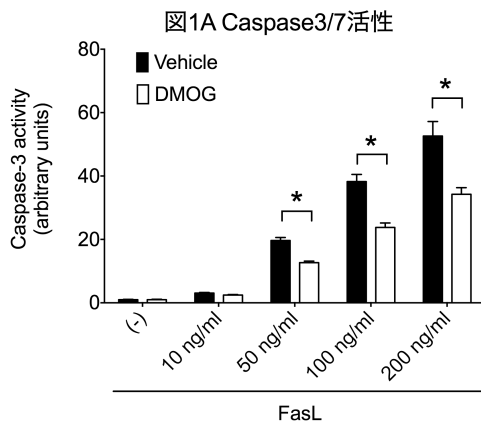
### (9) 統計学的解析

データは平均 ± SEM で示した。二元配置分散分析及び post hoc 解析としてスチューデント T 検定、あるいは一元配置分散分析及び post hoc 解析としてダネット検定を用いて解析をした。解析は Prism 6 (GraphPad)を用いて行い、 $P < 0.05$  を有意水準として設定した。

## 4. 研究成果

### (1) DMOG の MLE12 細胞に対する抗アポトーシス効果

DMOG を 0.25mM-2mM の濃度で投与することによって MLE12 細胞中の HIF-1 タンパクが増加することが確かめられた。これを受けて、以後の実験においては DMOG 濃度は 1mM で行うこととした。FasL を投与した所、Caspase3/7 活性の増加、細胞生存率が低下し、アポトーシスが生じていると考えられた。FasL 投与 24 時間前から DMOG を投与しておくことで、Caspase3/7 活性(図 1A)、細胞生存率の変化(図 1B)を抑制することが出来た。



### (2) DMOG による抗アポトーシス効果の HIF-1 依存性の確認

100nM のエキノマイシン(HIF-1 の DNA 結合阻害剤)を投与することで DMOG 投与による HIF-1 下流遺伝子の mRNA の増加を完全に阻害することが出来た。エキノマイシン投与下において、DMOG による抗アポトーシス効果は消失していた(図 2A, B)。

さらに、HIF-1 を siRNA でノックダウンして、同様の実験を行った。siRNA のトランスフェクションによって MLE12 細胞の HIF-1 は ELISA による検出限界以下まで低下した。HIF-1 ノックダウンにおいても同様に DMOG による抗アポトーシス効果は消失した(図 3A, B)。

これらの結果から DMOG による抗アポトーシス効果は HIF-1 依存的事であることが示された。

図2A Caspase3/7活性

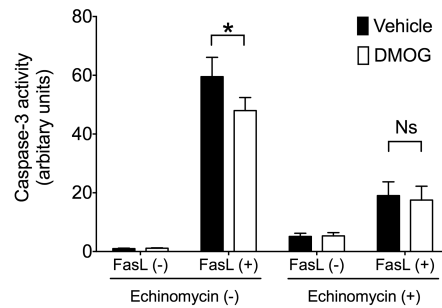


図2B 細胞生存率

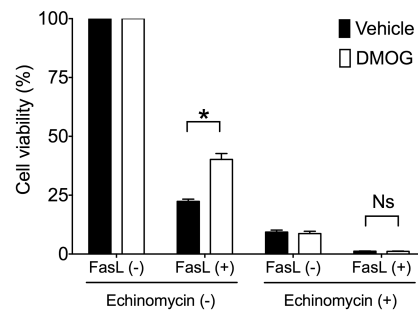


図3A Caspase3/7活性

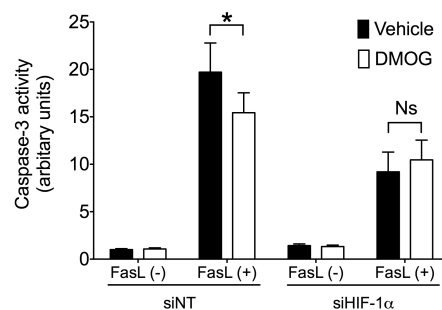
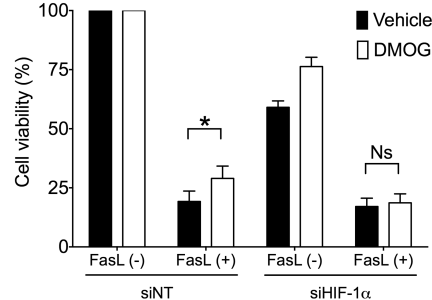
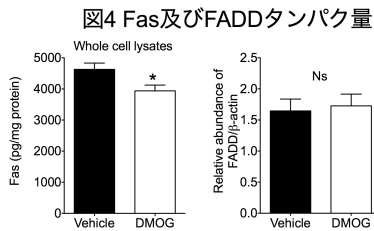


図3B 細胞生存率



### (3) DMOG の Fas, FADD の発現に与える影響

DMOG の抗アポトーシス効果の機序について調べるために、FasL 誘導性アポトーシスにおけるレセプター及びアダプタータンパクである Fas、FADD のタンパク量を定量した(図 4)。Fas のタンパク量は DMOG の投与によって有意に低下した。一方、FADD タンパクには変化は見られなかった。

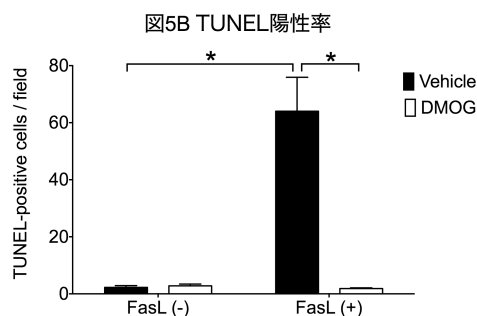
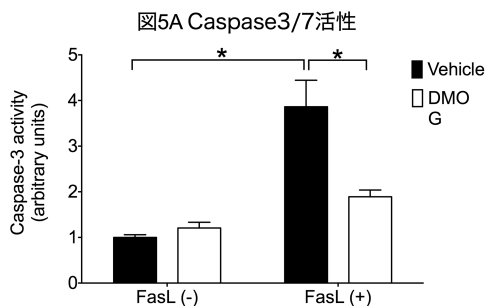


以上から Fas タンパクの発現低下が DMOG による抗アポトーシス作用のメカニズムである可能性が示唆された。しかしながら, Fas の発現低下は統計学的に有意ではあるものの, その程度は 10-20%程度であり, それ以外の機序が関与している可能性も考えられた。

#### (4) DMOG の FasL 誘導性肺傷害マウスに対する効果

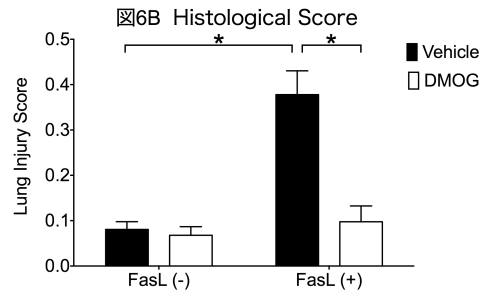
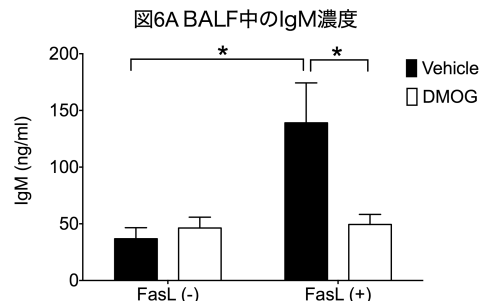
DMOG による抗アポトーシス効果が動物モデルにおいても見られるのか検討を行った。DMOG を腹腔内投与することで, 肺組織中の HIF-1 タンパクが増加, また Fas タンパク量が低下することが確認できた。

FasL を気管内投与することで caspase-3/7 活性の増加(図 5A), TUNEL 陽性細胞の増加が見られた(図 5B)。一方で, DMOG を投与することでこれらの変化は抑制された。



さらに肺胞バリアー透過性の指標として BALF 中の IgM 濃度を測定した所, DMOG によって FasL 気管投与による IgM 濃度の増加が抑制された(図 6A)。

また, DMOG 投与は組織学的スコアの増加も著明に抑制した(図 6B)。以上から, PHD 阻害薬 DMOG は FasL 誘導性のアポトーシスを抑制を通して, 肺傷害の治療に有向である可能性が示された。



#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 3 件)

Yusuke Nagamine, Kentaro Tojo, Takuya Yazawa, Shunsuke Takaki, Yasuko Baba, Takahisa Goto, Kiyoyasu Kurahashi, Inhibition of Prolyl Hydroxylase Attenuates Fas Ligand-induced Apoptosis and Lung Injury in Mice, 2016 ATS International Conference, 2016 年 5 月 17 日, San Francisco, USA.

Yusuke Nagamine, Kentaro Tojo, Takuya Yazawa, Shunsuke Takaki, Yasuko Baba, Takahisa Goto, Kiyoyasu Kurahashi, Dimethylxalylglycine, a Prolyl Hydroxylase Inhibitor, Attenuates Fas ligand-induced Apoptosis and Lung Injury in Mice, 第 56 回日本呼吸器学会学術集会, 2016 年 4 月 8 日, 京都国際展示場(京都府, 京都市)

長嶺祐介, 東條健太郎, 高木俊介, 馬場靖子, 後藤隆久, 倉橋清泰, Prolyl hydroxylase 阻害はマウスにおいて Fas/Fas リガンド系アポトーシスによる肺傷害を軽減する, 日本麻酔科学会第 62 回学術集会, 2015 年 5 月 29 日, 神戸国際展示場(兵庫県, 神戸市)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高木 俊介 (TAKAKI, Shunsuke)

横浜市立大学・医学部・講師

研究者番号：90644823